

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720061152139

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

环孢菌素 A 联合苦参碱逆转 K562/ADM 细胞多药耐药的 研究及微流控芯片检测药物外排的应用

Effect of Cyclosporine A and Matrine on the Reversion of
Multidrug Resistance of K562/ADM Line and Application of
Microfluidic chip in the Study of Drug Efflux Modulation

陈 怡

指导教师姓名: 彭兴跃 副教授

专 业 名 称: 微生物

论文提交日期: 2009 年 8 月

论文答辩时间: 2009 年 9 月 9 日

学位授予日期: 2009 年 9 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 09 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

环孢菌素 A 联合苦参碱逆转 K562/ADM 细胞多药耐药的研究及 微流控芯片检测药物外排的应用

硕士研究生：陈怡

指导教师：彭兴跃 副教授

摘 要

目的：本课题旨在研究环孢菌素 A (CsA)及苦参碱(MAT)单独及联合应用对人慢性粒细胞白血病急性红白血病变细胞株 K562 及其耐阿霉素(ADM)细胞株 K562/ADM 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)表达的影响，以探讨它们逆转多药耐药(MDR)的作用机理，为环孢菌素 A 和苦参碱作为耐药逆转剂的临床应用提供理论依据。并探讨微流控芯片在检测白血病耐药细胞株药物外排功能中的应用前景，为临床逆转 MDR 的药物筛选提供新的策略和方法。

方法：实验组分为下列几组：(1)K562/S 敏感细胞组；(2)K562/ADM 耐药细胞组；(3)K562/ADM+CsA 组；(4)K562/ADM+MAT 组；(5)K562/ADM+CsA+MAT 组。MTT 法测定逆转剂环孢菌素 A 或/和苦参碱的细胞毒性及药物作用后的逆转倍数，流式细胞术测定细胞凋亡百分率的变化，以评价环孢菌素 A、苦参碱单独及联合与阿霉素共同作用下对 K562/ADM 阿霉素耐药的逆转效果。荧光分光光度法、流式细胞仪(FCM)检测细胞内药物(ADM)浓度的改变，微流控芯片检测白血病耐药细胞株药物外排。免疫组化法检测 MDR-1 基因编码的 P-gp 表达变化，流式细胞术定量检测 P-gp 变化，以探讨环孢菌素 A 及苦参碱逆转 MDR 机制与 P-gp 介导的药物转运能力改变之间的关系。

结果：1.环孢菌素 A 和苦参碱对 K562/S 及 K562/ADM 均有明显的抑制作用，且 IC_{50} 接近，无统计学差异($P>0.05$)。非细胞毒性剂量的两药联合应用后未出现毒性叠加，以环孢菌素 A 及苦参碱对 K562/ADM 细胞的非细胞毒性剂量作为最佳的逆转浓度；2.在与 ADM 合用时，K562/ADM+CsA 组及 K562/ADM+MAT 组的 IC_{50} 均低于 K562/ADM 耐药组($P<0.01$)，但高于 K562/ADM+CsA+MAT 组($P<0.01$)，二药联合应用时逆转倍数大于两者单独作用之和。与 Annexin V -FITC 流式细胞术检测

的细胞凋亡百分率增加是一致的；3.K562/ADM+CsA 组、K562/ADM+MAT 组和 K562/ADM+CsA+MAT 组，细胞内 ADM 浓度明显增加，与 K562/ADM 对照组间有显著性差异($P<0.01$)。微流控芯片检测结果和 FCM 法的结果基本一致；4.免疫组化法的结果显示，与 K562/S 比较，K562/ADM 细胞中 P-gp 呈高表达；5.与 K562/ADM 耐药组比较，K562/ADM+MAT 组 P-gp 表达量降低($P<0.01$)，而 K562/ADM+CsA 组 P-gp 表达量无明显变化($P>0.05$)，但两者联合应用时作用大于两者单独作用之和。

结论：1.环孢菌素 A 和苦参碱均是有效的抗肿瘤药，且 K562/ADM 对其不具耐药性，非细胞毒性剂量的两药联合时无毒性的叠加；2.非细胞毒性剂量的环孢菌素 A 和苦参碱均可部分逆转有多药耐药表型的细胞株 K562/ADM 对阿霉素的耐药性，二者联合应用效果优于单独应用，具有协同作用；3.微流控芯片检测白血病耐药细胞株药物外排的方法具有一定可行性，在 MDR 逆转药物的筛选和肿瘤个体化治疗方面有良好的应用前景；4.K562/ADM 细胞中多药耐药基因 MDR-1 编码的 P-gp 过度表达可能是引起 K562/ADM 细胞产生 MDR 的主要原因；5.环孢菌素 A 与苦参碱联合用于逆转 MDR 时，主要机制可能是通过下调 P-gp 的表达。

关键词：K562/ADM 细胞株；多药耐药；环孢菌素 A；苦参碱；微流控芯片

Effect of Cyclosporine A and Matrine on the Reversion of Multidrug Resistance of K562/ADM Line and Application of Microfluidic chip in the Study of Drug Efflux Modulation

Postgraduate: Yi Chen

Supervisor: Prof. Xing Yue Peng

Abstract

Objective: This paper was to study the reversal effect of cyclosporine A(CsA) and matrine(MAT) on multidrug resistance cell line K562/ADM and to investigate the reversal mechanism of this combination, and to provide theoretic evidence of the clinical application of them as resistance modifying agents, then to evaluate microfluidic chip in detecting the modulation of drug efflux of anticancer compounds by MDR modulators at single cell level.

Method: The major group was divided as follows: (1)K562/S cell line; (2)K562/ADM cell line; (3)K562/ADM cell line with CsA; (4)K562/ADM cell line with MAT; (5)K562/ADM cell line with CsA and MAT. Cell toxicity and reversal time of CsA and/or MAT on tumor cells were determined by MTT assay. Cell apoptosis percentage was determined by flow cytometry. The reversal effect of CsA and MAT along with ADM on K562/ADM was discussed with the mentioned data above. Intracellular drug concentration was determined by spectrophotofluorometry, flow cytometry and microfluidic chip, respectively. In order to discuss the mechanism of reversal effect of CsA and MAT, expression of P-gp coded by MDR-1 gene was observed using immunohistochemical technique and changes of P-gp were determined by flow cytometry.

Results: 1.CsA or MAT could inhibit the growth of K562/S and K562/ADM, its IC₅₀ had no statistical difference ($P>0.05$). Non-cytotoxic dosage and low-cytotoxic dosage

of CsA and MAT were determined by MTT assay. Non-cytotoxic dosage was selected as reversal dosage; 2.Used along with ADM, IC_{50} of both K562/ADM with CsA and K562/ADM with MAT were lower than that of K562/ADM($P<0.01$), but still higher than that of K562/ADM with CsA and MAT($P<0.01$). When two agents combined together, the reversal effect was better than that of the sum of CsA or MAT alone, coinciding with the increasing of cell apoptosis percentage determined by FCM; 3.CsA and MAT (alone or combination) enhanced the intracellular ADM accumulation in K562/ADM, higher than that of K562/ADM ($P<0.01$). The result of intracellular ADM accumulation detected by microfluidic chip coincided with the result detected by FCM; 4.Immunohistochemical results showed the overexpression of P-gp in K562/ADM; 5.P-gp expression of K562/ADM with MAT was lower than that of K562/ADM($P<0.01$), but still higher than that of K562/ADM with CsA and MAT($P<0.01$). And no significant difference on P-gp expression was found between K562/ADM with CsA and K562/ADM($P>0.05$).

Conclusions: 1.CsA and MAT were effective antitumor drugs with inhibiting effect on tumor cells. K562/ADM had no drug resistance to CsA and MAT; 2. Non-cytotoxic dosage of CsA and MAT could partly reverse the MDR of K562/ADM. The effect of combination of two agents was superior to that of single use due to their coordinate effect; 3.A microfluidic chip that was capable of selecting and retaining single multidrug-resistant cancer cells can be used to investigate drug efflux inhibition in leukemia cell lines effectively. This novel method has an extensive application for drug selection and individual anticancer therapy in future; 4.Over expression of P-gp was related to mechanism of MDR; 5.The reversing mechanism of CsA and MAT has relation to the decreasing of P-gp probably.

Key Words: K562/ADM cell line; Multidrug resistance (MDR);

Cyclosporine A; Matrine; Microfluidic chip

目 录

1 前言	1
1.1 白血病的多药耐药性及其机制	1
1.2 白血病多药耐药的干预对策	7
1.3 微流控芯片技术在生物学中的应用	10
1.4 本文研究的目的与意义	14
2 材料与方法	16
2.1 材料	16
2.2 常用溶液、培养基的配置	16
2.3 主要仪器	17
2.4 基本方法	18
2.4.1 细胞培养及实验分组	18
2.4.2 MTT 法测定 CsA 与 MAT 的细胞毒性及耐药细胞的耐药倍数	19
2.4.3 MTT 法测定细胞的药敏性	19
2.4.4 Annexin V -FITC 流式细胞仪检测耐药细胞的凋亡百分率	20
2.4.5 荧光分光光度法检测逆转剂对细胞内药物(ADM)浓度的影响	20
2.4.6 玻璃微流控芯片的制作	21
2.4.7 P-gp 外排功能的微流控芯片检测	22
2.4.8 P-gp 外排功能的流式细胞仪测定	24
2.4.9 免疫组化法检测 P-gp 表达	25
2.4.10 流式细胞术检测细胞的 P-gp 表达变化	25
2.4.11 细胞冻存	25
2.4.12 统计学处理	26
3 结果与讨论	27
3.1 结果	27
3.1.1 K562/ADM 细胞多药耐药的逆转	27
3.1.2 药物外排的检测	32
3.1.3 CsA 和 MAT 联合逆转 K562/ADM 细胞耐药机制的探讨	39
3.2 讨论	42
4 结论	47
5 展望	48
6 参考文献	49
7 致谢	56

1 前言

白血病(leukemia)是造血系统的恶性肿瘤,它是由于造血干细胞受损,细胞失去进一步分化成熟的能力而阻滞在细胞发育的不同阶段。细胞增殖过度、分化受阻和凋亡障碍是白血病细胞的基本生物学特征^[1]。目前,化学治疗仍是白血病治疗的主要手段,它可使 60%~80%的初发患者获得缓解,生存期得以延长,但多数患者终因复发后治疗失败而死亡,导致化疗失败的原因是多方面的,其中最主要的是白血病细胞的耐药性。

1.1 白血病的多药耐药性及其机制

白血病耐药性是指白血病细胞对化疗药物的不敏感性,它既可以天然存在(内源性耐药),也可以由抗癌药物诱发(获得性耐药)。多药耐药(multidrug resistance, MDR)是其最重要的耐药形式之一,它是白血病细胞接触一种抗癌药物后产生的对多种结构和功能不同的抗癌药物的耐受性。

关于多药耐药产生机制以及如何克服耐药性问题一直是国内外专家的研究热点。目前已经提出的 MDR 发生的机制主要有以下几种^[2]:

1.1.1 转运蛋白介导的药物外排机制

参与药物外排机制的膜蛋白主要有 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白(Multidrug Resistance Protein, MRP)、肺耐药相关蛋白(Lung Resistance Protein, LRP)和乳腺癌耐药蛋白(Breast Cancer Resistance Protein, BCRP)。

1.1.1.1 多药耐药基因及其编码的 P-糖蛋白的过度表达

目前认为由多药耐药基因 MDR1 编码的 P-gp 的过度表达所介导的耐药是经典的耐药途径^[3]。该蛋白的表达水平与细胞膜的通透性、细胞内药物浓度以及细胞耐药程度相关。化疗药物问世不久,临床上就发现了多药耐药现象,如对阿霉素耐药的肿瘤能对从未使用过化疗药物如长春新碱类和表鬼臼毒素类产生耐药。1976 年 Juliano 和 Ling^[4]在中国仓鼠卵巢细胞秋水仙素耐药株中发现了一种分子量为 170KD 的糖蛋白,被命名为 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)。P-gp 在敏感细胞中通常检测不出,而在 MDR 细胞株中却有高水平表达。P-gp 是一种跨膜糖蛋白,由人类 MDR 基因家族中与耐药有关的 MDR1 基因编码的^[5]。人类 MDR1 基

因定位于第 7 号染色体的 q21.1 带的 330kb 中, 编码 4.5-5.0kb mRNA, 其编码的 P-gp 是由 1280 个氨基酸组成的 2 个完全相同的单体组成, 在第一 640 碱基对和第二 640 碱基对间存在有 48% 的同源部分, 每一部分都含有 6 个跨膜疏水区和一个 ATP 结合位点, 所以完整的 P-gp 分子中有 12 个跨膜区和 2 个 ATP 结合位点; 跨膜区作为膜通道有利于物质转运, 而 ATP 结合位点与能量供应有关^[6]。故 P-gp 具有能量依赖的跨膜药物外排泵功能, 可将细胞内多种抗肿瘤药物泵出胞外, 使胞内药物浓度积聚浓度下降, 细胞毒作用降低或完全丧失, 细胞产生耐药, 呈现典型 MDR 表型。在体外筛选抗药细胞系时发现, 细胞从敏感到抗药, 其 P-gp 水平与抗药程度呈正相关。冯凯^[7]等运用免疫组化技术对 10 例正常骨髓及 42 例急性白血病(AL)患者检测 P-gp, 其中初治病人 P-gp 阳性表达检出率为 28.6%, 难治、复发病病人阳性检出率为 58.8%, 完全缓解病人阳性检出率为 9.1%。几乎所有的人类肿瘤细胞均有不同程度的 MDR1/P-gp 的表达, 但临床观察表明那些对化疗不敏感或疗效差的肿瘤往往有较高的 MDR1 基因表达^[8]。由 P-gp 介导的 MDR 习惯上称典型 MDR, 其本质还有待进一步的深入研究, 但应当指出, P-gp 并不能解释所有的肿瘤耐药现象, 一些非 P-gp 介导的 MDR 已逐渐受到重视。

1.1.1.2 多药耐药相关的蛋白的异常表达

1992 年, Cole^[9]等从有 MDR 表型但无 P-糖蛋白(P-gp)过度表达的人小细胞肺癌(SCLC)耐药细胞系 H69AR 中, 分离出一种过度表达的 mRNA, 认为它与 MDR 有关, 将其编码的蛋白命名为多药耐药相关蛋白(Multidrug Resistance Protein, MRP), 它是分子量为 190KD 的一种膜糖蛋白, 有四种, 以 MRP1 为主。MRP 有其独立的基因编码, 定位于染色体 16p13.1 上, 编码 6.5kb mRNA, 由 1531 个氨基酸组成, MRP 与 P-gp 有许多相似之处, 在氨基酸序列上有 14% 同源性, 同源序列集中于 ATP 结合区^[10]。MRP 与 P-gp 一样, 也是一种能量依赖泵, 表达 MRP 的肿瘤细胞也具有药物外排泵的作用, 从而呈现非 P-gp 的 MDR 表型^{[11] [12]}。Schneider^[13]等报道, MRP 的表达水平与白血病复发有相关性, 在急性淋巴细胞性白血病(ALL)复发时 MRP 的水平平均升高了 2 倍。王福旭^[14]等运用半定量逆转录-聚合酶链反应, 检测了 65 例 AL 患者骨髓和 15 名正常人外周血单个核细胞中 MRP 基因的表达, 发现复发难治者 MRP 的平均表达水平及阳性率最高, 与正常对照组、初治组、长期生存组之间均有显著差异($P < 0.05$), 长期生存组与正常对

照组之间无统计学意义,同时检测了 65 例 AL 患者 MDR1 基因的表达,发现临床耐药组 MRP 和 MDR1 平均表达水平及阳性率均明显高于临床非耐药组,MRP 和 MDR1 基因表达水平之间无相关性,说明 MRP 基因的过表达可导致临床耐药,但与 MDR1 基因机制不同。

目前关于以上两种转运蛋白有两种实验模型解释他们的 MDR 现象^[9]:一是两者都是 ATP 依赖型药物外排泵,可将化疗药物从肿瘤细胞内泵出细胞,减少药物聚集,并且胞浆内的 MRP 还与化疗药物在肿瘤细胞内的异常分布有关,使接触靶位的药物减少,从而引起 MDR;第二种模型是二者可改变细胞膜电位,从而影响其对药物的敏感性。

1.1.1.3 肺耐药相关蛋白的异常表达

肺耐药相关蛋白(Lung Resistance Protein, LRP)是 1993 年 Scheper^[15]等新发现的一种与 MDR 有关的蛋白质,它是由 896 个氨基酸组成的分子量为 110KD 的穹隆蛋白(vault protein),是一种非糖蛋白,定位于第 16 号染色体短臂 p13.1-p11.2,与 MRP 的基因位置十分接近。LRP cDNA 全长 2.7kb,经测定发现其氨基酸序列有 87.7%和褐鼠的穹隆体蛋白具有同源性,故推测 LRP 是胞浆细胞器穹隆中的主要核蛋白颗粒。据报道^{[16][17]} LRP 能够介导对顺铂、烷化剂等一些 P-gp 不能介导的药物耐受,这些药物的一些共同特点是以 DNA 为靶点,这就提示 LRP 可能主要通过核靶点屏蔽机制引起 MDR。Scheffer^[18]等分析 LRP 介导的耐药机制可能是一方面参与细胞核与细胞质间物质交换的调控,使药物从核到胞浆重新分布,使那些以细胞核为靶点的药物不能通过核孔进入细胞核,有些药物即使进入了核内,也很快被转运到胞质中。另一方面与细胞质中的化疗药物被包裹在隔离囊泡内,并通过胞吐机制排出胞外无法发挥作用有关。此外,在正常组织及肿瘤组织中也有程度不一的 LRP 的表达,在肠道、肾小管上皮等具有分泌或排泄功能的组织中呈现高表达,从表达水平的高低可反应不同肿瘤对化疗敏感性及预后的差异^[17]。

1.1.1.4 乳腺癌耐药蛋白的异常表达

1998 年 Doyle^[19],等报道发现了乳腺癌耐药蛋白(Breast Cancer Resistance Protein, BCRP)。新近发现的 BCRP 与 P-gp、MRP 都属于 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白超家族成员。BCRP 也是通过药物外排泵的作用降低细胞

中化疗药物的聚集，从而引起如 MDR。

1.1.2 酶介导的耐药机制

1.1.2.1 谷胱甘肽解毒途径酶活性改变

谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)是一组与细胞内化学物质代谢和物质转运有关的同工酶系,是 GST 超基因家族相应基因编码的一个与细胞解毒功能有关的多功能蛋白质家族。GST 活性增高,细胞解毒能力增强,药物毒性降低,细胞表现为耐药,主要发生在烷化剂及铂类药物。人类 GST 分为两类:胞浆型 GST 和膜结合型 GST。Mannervik^[20]根据酶的结构、免疫学特性和活性又分为:GST- α 、GST- μ 和 GST- π 。其中 GST- π :在一些癌变组织和诱发的转化组织细胞中的含量、活性和 mRNA 表达均有升高,是目前认为与 MDR 的关系最密切一种 GST^[21]。GST- π 在耐药细胞中发挥的作用可归纳为 3 方面:(1)GST- π 催化谷胱甘肽的巯基与化疗药物的亲电中心结合形成硫醚连接的谷胱甘肽结合物,或者发挥其自身具有的过氧化物酶的作用,在耐药中通过过氧化物作用防止化疗药物代谢生成的活性氧类对膜磷脂的损伤;(2)GST- π 作为 II 相代谢酶直接与药物代谢产生的亲电性中间产物结合,从而降低化疗药物的毒性作用;(3)直接引起药物的活化,以导致细胞毒性的改变^[22-24]。蔡鹏^[25]等报道以顺铂、CTX、阿霉素为主治疗后病人的血浆谷胱甘肽含量比正常人及化疗前明显增高($P<0.05$),而在化疗以前病人与正常人之间无显著性差异($P>0.05$),提示血浆谷胱甘肽增高与运用上述抗癌药有关,临床出现耐药者血浆谷胱甘肽明显高于化疗组平均值($P<0.01$),说明二者可能相关。

此外 GSH 合成酶、降解酶通过调节 GSH 含量也与 MDR 有关。

1.1.2.2 DNA 拓补异构酶 II 活性下降

DNA 拓补异构酶 II(topoisomerase, TOPO)是能催化 DNA 超螺旋结构局部构型改变的基本核酶,可分为拓补酶 I (Topo I)和拓补酶 II (Topo II),前者介导一条 DNA 链断裂,后者可同时切断两条 DNA 链,并瞬间变构再连接起来。Topo II 在 DNA 复制、转录、修复、重组、有丝分裂及染色体分离、浓缩等生物学过程中发挥重要作用^[26]。多种以 Topo 为靶点的抗癌药物,选择性抑制增殖期 DNA 复制细胞来发挥抗肿瘤效应,如 DNA 嵌入剂-蒽环类、胺苄定等;非 DNA 嵌入剂-鬼臼噻吩甙等均通过抑制拓补异构酶的活性,干扰 DNA 的遗传代谢从而发挥抑制

肿瘤细胞生长的药理作用；同时 Topo 还有助于以 DNA 为靶点的化疗药物与 DNA 交联，引起 DNA 断裂，导致肿瘤细胞死亡。因此，Topo 的质、量或构型改变都会产生 MDR，且没有 *mdr1* 基因过度表达，细胞的药物流入及细胞内药物浓度等与亲代敏感细胞无明显差别，这在一些耐药细胞中已得到证实，故又称为非典型 MDR^[27]。其耐药发生的机理目前主要归纳为：①耐药细胞相关基因的改变：Topo II 基因调节异常，下调蛋白质和 mRNA 水平；基因点突变；②DNA-Topo 活性和含量的改变：酶的磷酸化、甲基化作用③DNA-Topo 调控因素的改变等最终导致细胞内总酶活性降低，药物与 Topo II 及 DNA 复合体的结合较为松弛，影响了肿瘤细胞对药物的反应强度^[27]。郑文莉^[28]等报道对 17 例初治化疗前及 20 例化疗后的 AL 患者外周血或骨髓白血病细胞 DNA Topo II 活性测定，对 18 例化疗后患者 P-gp 及 *mdr1* 基因表达检测，发现化疗后患者白血病细胞 Topo II 活性较化疗前组显著降低($P<0.05$)，15 例临床疗效差，其中 12 例 P170 及 *mdr1* 基因表达阳性，3 例表达阴性，而 Topo II 活性均降低，表明了 Topo II 活性下降可能是患者对抗肿瘤药物耐受另一重要原因，亦提示耐药的产生是多因素和复杂的，多种耐药机制可能共存于同一细胞或细胞系中。

1.1.2.3 二氢叶酸还原酶的突变

二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)是细胞内叶酸代谢的关键酶，分子量为 22KDa，DHFR 能催化二氢叶酸还原成四氢叶酸，后者在胸腺嘧啶合成酶的作用下参与 DNA、RNA 及蛋白质的合成。抗代谢类抗癌药物氨甲喋呤(MTX)是一种叶酸类似物，能竞争性地与靶酶 DHFR 的活性位点紧密结合而使其失活，导致细胞内四氢叶酸含量下降，细胞 DNA 合成异常，引起细胞死亡。研究发现，在治疗中一些肿瘤细胞很容易对 MTX 产生耐药，其产生机制因素很多，其中以 DHFR 基因选择性扩增(在对 MTX 有耐药性的细胞)和 DHFR 基因突变为主要因素。目前，应用点突变和联合突变技术已获得了许多 DHFR 突变体，其中部分显示了较强的 MTX 耐受性^{[29] [30]}。

1.1.2.4 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶的高表达

O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase, MGMT)能修复许多烷化剂类抗癌药物(如氮芥类)所诱导产生的 O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA 加成物，在 DNA 损伤修复中起重要作用。肝脏表达较高水平的 MGMT，而

脑和骨髓则表达较低水平的 MGMT 蛋白。MGMT 修复损伤的 DNA 时, O^6 甲基鸟嘌呤是 MGMT 优先结合的底物, 即使更复杂的烷基化物亦可被 MGMT 切除, 从而使肿瘤细胞产生耐药性^[31]。

1.1.2.5 醛脱氢酶过表达

在人类, 醛脱氢酶(aldehyde, ALDH)是由三种同功酶构成的一组酶, 某些肿瘤细胞系对环磷酰胺(CTX)的耐受性与 ALDH 基因表达相关。研究表明^[32]: CTX 是一种药物前体, 须在体内经过生物转化成 4-羟环磷酰胺(4-HC), 4-HC 与其开链式醛磷酰胺之间存在互变异构平衡醛磷酰胺经历一次 β 消除反应, 形成丙烯醛与活性代谢产物磷酰胺芥, 产生细胞毒作用。而 ALDH 能将醛磷酰胺氧化成无毒的羧基磷酰胺, 从而出现癌细胞耐药。此外, 在所有的血细胞中, 造血祖细胞的 ALDH 表达水平最高, 一旦细胞分化成熟, 则 ALDH 表达降低。

1.1.2.6 蛋白激酶 C 活性的改变

蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)是一种钙离子、磷脂依赖, 需二乙酰甘油活化的激酶, 是一个超基因家族编码同源性很高的相关分子组成的一组酶。目前研究表明 PKC 在 MDR 的发生发展中也起到重要的作用, 它的机制为: PKC 可以参与调节 P-gp 磷酸化程序, 提高 P-gp 生物活性。

此外, 超氧化物歧化酶, 谷胱甘肽氧化酶^[33], 与 DNA 损伤修复能力有关酶如核酸内切酶、DNA 聚合酶及 DNA 连接酶等也被证实与肿瘤细胞多药耐药有关。

1.1.3 与凋亡有关的机制^[34]

目前使用的许多抗肿瘤药物同时又是细胞凋亡的诱导剂, 从这个意义上说, 耐药的发生便是对肿瘤细胞凋亡的抑制, 因而与凋亡有关的因素如 BCL-2 基因、突变 P53 基因等也可能与耐药的发生有关, 与细胞凋亡相关的因子及基因异常也是引起肿瘤细胞耐药的重要因素。

1.1.3.1 BCL-2 基因

BCL-2 基因是一重要的原癌基因, 其主要的生理功能是抑制细胞凋亡, 同时又是一种耐药基因, 其导致耐药的主要机理是通过抑制肿瘤细胞的凋亡而实现的。目前又很多的抗肿瘤药物就是通过一起细胞凋亡而引起细胞死亡的, 激活细胞凋亡基因的丢失或抑制细胞凋亡基因的过度表达都会导致肿瘤细胞产生耐药。BCL-2 过度表达时, 药物仍能够流入细胞引起细胞损伤, 但这种损伤不会转换成

有效的死亡信号，从而导致肿瘤不死或死亡率明显降低，表现为耐药。

1.1.3.2 P53 基因

野生型 P53 基因在细胞生长过程中监视细胞内 DNA 状态，当 DNA 受损时，P53 通过转录后稳定机制抑制细胞停留在 G1 期，使细胞有时间修复，若修复失败，将引发凋亡；当 P53 基因缺失或突变时将失去监视作用，不能诱导受损细胞的凋亡，细胞得以生存而导致耐药。

1.1.3.3 CD95 基因

CD95(Fas)是相对分子质量为 45000 的 I 型膜蛋白，属于肿瘤坏死因子 (TNF) 受体家族成员，CD95 配体(CD95L)是相对分子质量为 37000 的 II 型膜蛋白，属于 TNF 和 CD40 配体家族成员。CD95 和 CD95L 抗原广泛表达于许多组织细胞和被激活细胞表面。CD95 和 CD95L 系统是调控凋亡的关键基因，药物杀伤癌细胞与凋亡有关。当化疗剂量的化疗药物引起肿瘤细胞 CD95 改变，从而启动肿瘤细胞程序性死亡(procedure cell death, PCD)，耐药株细胞表面 CD95 表达低于敏感株，耐药细胞表面与 CD95L 结合的机会也低于敏感株。因此耐药细胞就可以通过改变 CD95/CD95L 来拮抗化疗药物所致的凋亡。

1.1.4 其他耐药机制

线粒体 ATP 酶呼吸链活性在药物诱导的凋亡中有一定的作用，其活性的变化可能为新耐药机理^[35]。研究还表明，耐药与细胞生活环境变化有关，如 pH 值、温度等都影响耐药的形成，所以有人提出变细胞耐药性为组织耐药性^[36]。

但是，同一耐药细胞常有几种不同的耐药机制共同参与，协同发挥作用。Uaraski 等^[37]报道用不同剂量柔红霉素(DNR)诱导产生的 K562/DNR 多药耐药细胞中存在 P-gp 过表达，同时在该细胞中检测到 Topo II 活性降低，提示 P-gp、Topo II 机制同时参与该耐药过程。

1.2 白血病多药耐药的干预对策

对肿瘤多药耐药研究的同时，人们也开始着手逆转肿瘤多药耐药的研究，经过大量研究发现多种药物有逆转 MDR 的作用。逆转剂是指全部或部分恢复耐药的肿瘤细胞对化疗药物敏感性的一类物质。根据其作用机制可分为以下几种类型。

1.2.1 耐药逆转剂(resistance reversal agents)

1.2.1.1 以 ATP 结合膜蛋白为作用靶点的逆转剂

此逆转剂有钙通道阻滞剂(维拉帕米及其衍生物)、吩噻嗪类化合物(三氟拉嗪)、免疫调节剂(环孢菌素 A 及其衍生物)、类固醇激素(甲地孕酮和黄体酮)、雌激素拮抗剂(他莫西芬和托瑞米芬)、喹啉类(奎宁和奎尼丁)、哌啶类衍生物(VX-710, S-9788)、γ 啉类衍生物(GF120918)及磺酰脲类(格列本脲及其衍生物)等。其中临床实验研究较多的是维拉帕米(verapamil, VRP)和环孢菌素 A(CsA)。目前已发现, VRP 逆转 MDR 的机制是通过与抗癌药物竞争 P-gp 的相关结合位点增加抗癌药物在细胞内的储留, 并且使 *mdr1* 基因的转录下调。CsA 有明显的逆转 MDR 的作用, 其衍生物 PSC-833 较 CsA 对肾的毒性更低, 且没有免疫抑制活性, 逆转 MDR 的作用比 CsA 强 10 倍, 它可抑制 P-gp 的功能而不影响 P-gp 的表达水平^[38]。PSC-833 通过非竞争性的方式与 P-gp 结合而逆转 MDR, 但同时也增加了抗癌药物对人体的毒性;目前认为是由于表达 P-gp 的正常组织受到了影响。

1.2.1.2 以 GST、Topo II 为作用靶点的逆转剂

依地尼酸(ethacrynic acid, EA)是 GST 的抑制剂, 不仅可抑制 GST 的活性, 而且对 MRP 有较高的亲和力, 可抑制 MRP 的功能。体内药代动力学发现, 在 GST 的催化下, 以 EA 作为底物与 GSH 结合形成的 EA-GSH 复合物, 是一种比 EA 更有效的 GST 抑制物。另外, 以 Topo II 为作用靶点的逆转剂主要是喜树碱类衍生物, 以蛋白激酶 C 作为靶点的抑制剂主要有星状孢子类衍生物和 N-肉豆蔻酰化 PKC 伪底物肽类。以上逆转剂的共同特点是, 毒副作用较大, 使其临床应用受到限制。

从研究其构效关系入手, 针对以上逆转剂合成新的高效低毒的衍生物已成为目前研发化合物逆转剂的主要方向。改变药物的剂型也可增加逆转的效果。以脂质体或脂肪乳剂包裹的 CsA 可改变药物的分布特性, 选择性地作用于肿瘤细胞, 减少 CsA 的相关毒性, 增加其逆转的作用^[39]。利用脂质体、微球体携带药物, 可通过胞吞作用进入细胞而克服耐药。目前研究较多的是脂质体阿霉素, 其具有肿瘤组织分布多、抗瘤活性强及毒性低等特点。

1.2.2 以生物治疗作为逆转策略

1.2.2.1 细胞因子

已发现 α -干扰素(INF- α)和白细胞介素-2(IL-2)可增加柔红霉素(DNR)对白血

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库